

**Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident**

**Bescheinigung**

Die Übereinstimmung der angehefteten Ablichtung mit der in der Bibliothek des Deutschen Patent- und Markenamtes vorhandenen Offenlegungsschrift wird bestätigt.



**Aktenzeichen: 102 51 918.8**

München, den 13. Juni 2008

Im Auftrag

**Faust**





(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 51 918 A1 2004.05.19

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 51 918.A

(51) Int Cl. 7: C12N 15/90

(22) Anmeldetag: 08.11.2002

A01K 67/00

(43) Offenlegungstag: 19.05.2004

(71) Anmelder:

Horn, Carsten, Dipl.-Biochem. Dr., 10115 Berlin,  
DE

(72) Erfinder:

Antrag auf Nichtnennung

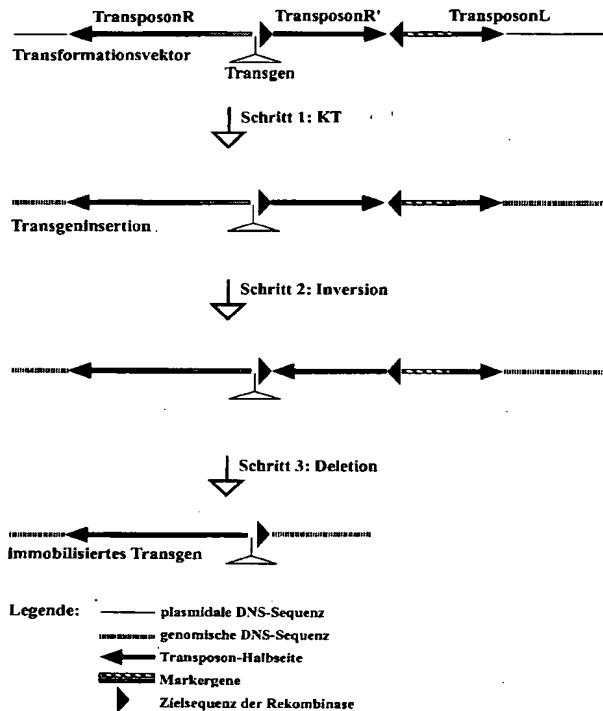
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Systeme zur Erzeugung stabiler genomischer Transgen-Insertionen

(57) Zusammenfassung: Konventionelle Transposon-basierte Keimbahn-Transformationsvektoren zur genetischen Manipulation von Insekten hinterlassen nach genomischer Integration des transponierbaren Bereichs intakte Transposon-Enden. Diese Enden sind als Substrat (kreuz)-mobilisierender Transposasen ursächlich für Remobilisierung und Destabilisierung der Transgeninsertion. In diesem Patentantrag werden Keimbahn-Transformationssysteme beschrieben, die eine Immobilisierung genomisch integrierter Transgene ermöglichen. Zu diesem Zweck werden um flexible Elemente erweiterte konventionelle Transposon-basierte Keimbahn-Transformationsvektoren offenbart. Alternativ wird dieses Ziel mittels einer DNS-Kassettenaustausch-Technologie erreicht. Aus beiden Ansätzen resultieren immobilisierte Transgen-Insertionen, eine wichtige Voraussetzung auch unter Sicherheitsaspekten für die Produktion gentechnisch modifizierter Insekten in industriellem Maßstab.

### Konditional exzisionskompetente Transformationsvektoren



### Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf neuartige methodische Vorgehensweisen zur Herstellung transgener Organismen (Transgenese). Der Schwerpunkt der Innovation beinhaltet technische Kunstgriffe zur Stabilisierung und sicheren Verankerung zuvor erfolgreich ins Zielgenom eingebrachter homologer oder heterologer DNS (im folgenden als Transgen bezeichnet). Hierzu wurden zwei Systeme an Transformationsvektoren entwickelt, die entweder Transposon-vermittelt oder Rekombinasevermittelt ein Transgen ins Zielgenom einschleusen und die Möglichkeit bieten, im Anschluß an die Keimbahntransformation mobilisierbare DNS-Bereiche zu entfernen. Stabile Transgen-Insertionen sind eine unverzichtbare Voraussetzung für die sichere Produktion gentechnisch modifizierter Organismen in großtechnischem Maßstab.

### Stand der Technik

[0002] Der derzeitige Stand der Technik zur Herstellung transgener Insekten ist die Transposon-vermittelte Keimbahntransformation (KT), die auf der Mobilisierbarkeit von DNS-Transposons bzw. von diesen abgeleiteten Transformationsvektoren basiert. Den verschiedenen KT-Systemen ist folgendes Grundprinzip gemeinsam: Spender-DNS wird von einem Transgenvektor ins Genom des Zielorganismus (Keimbahnzellen) übertragen. Dieser Prozeß wird von einer Transposase (vom Helfervektor bereitgestellt) katalysiert, welche Zielstellen der Spender-DNS erkennt und den von diesen Zielstellen eingeschlossenen Bereich ins Genom mobilisiert. Die Spender-DNS beinhaltet neben dem Transgen ein Transformationsmarkergen, dessen dominanter Phänotyp den Nachweis erfolgreicher KT ermöglicht.

[0003] Transposon-vermittelte KT-Methoden stehen heute für eine ganze Reihe von Insektenarten zur Verfügung: P-Element-basierte Systeme haben die Genetik der Taufliege, *Drosophila melanogaster*, revolutioniert (1), konnten aber aufgrund der Abhängigkeit der P-Elemente von *Drosophila*-endogenen Wirtsfaktoren (2) nicht außerhalb drosophilider Insekten eingesetzt werden. Medizinisch oder ökonomisch bedeutsamere Insektenarten wurden daher unter Verwendung wirtsunabhängiger „Breitband“-Transposontypen transformiert (3). Auf piggyBac-(4), Hermes-(5), Minos-(6) oder Mariner-(7) basierende Systeme der Transgenese stellen gegenwärtig die Technologieplattform zur gentechnischen Modifikation von Schad- und Nutzinsekten dar: Zu diesen zählen u.a. malariaübertragende anopheline oder culicine Mosquitos (8, 9), das Gelbfiebermosquito, *Aedes aegypti* (10, 11), die Mittelmeerfruchtfliege, *Ceratitis capitata* (12), oder der Seidenspinner, *Bombyx mori* (13). Das Anwendungspotential dieser Breitband-Transposons ist jedoch keineswegs auf Insekten beschränkt: Mariner-abgeleitete Transformationsvektoren integrierten stabil in der Keimbahn des Fadenwurms, *Caenorhabditis elegans* (14), des Zebrafisches, *Danio rerio* (15), und des Huhns, *Gallus* spp. (16).

[0004] Zum Nachweis erfolgreicher KT sind sowohl spezies-spezifische als auch spezies-unabhängige Transformationsmarker etabliert worden (17). Letztere besitzen den Vorteil der Übertragbarkeit auf verschiedene Zielspezies und konstituieren sich aus einem evolutionär konservierten Promotor, der die Expression eines fluoreszierenden Markerproteingens steuert (GFP [Grün Fluoreszierendes Protein] und Derivate oder Ds-Red, (18)). Als konservierte Promotorelemente in spezies-unabhängigen Transformationsmarkergenen fanden der polyubiquitin-(19) sowie der „3xP3“-(20)-Promotor bislang weitestgehende Anwendung.

[0005] Eine Transposon-unabhängige Technik, um gerichtet Spender-DNS ins Genom von Zellen einzuführen, macht sich das Prinzip der ortsspezifischen Rekombination zunutze: Diese Methode basiert auf einem Rekombinase-Enzym und zwei korrespondierenden heterospezifischen Zielstellen. Nach Markierung des Genoms mit einer DNS-Kassette (i.d.R. ein Positiv-Negativ-Selektionsmarkersystem tragend), kann die Spender-DNS, welche von zur genomischen DNS-Kassette identischen heterospezifischen Zielstellen flankiert ist, Rekombinase-vermittelt gerichtet an den markierten Locus gebracht werden. Dieses Prinzip wird als Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch (engl. RMCE für recombinase mediated cassette exchange) bezeichnet (21, 22). Die Funktionalität der DNS-Kassettenaustauschsysteme wurde in verschiedenen Zelllinien (darunter auch murine embryonale Stammzellen) sowohl unter Verwendung der FLP-Rekombinase und heterospezifischer FRT-Zielstellen (23, 24, 25) als auch unter Verwendung der Cre-Rekombinase und heterospezifischer loxP-Zielstellen (26) demonstriert. RMCE fand bislang zur Generierung transgener Invertebraten-Organismen keine Anwendung und es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß sich (zumindest dem Autor zugängliche) Patentschriften ausdrücklich auf Vertebratenzellen oder Vertebratenorganismen beziehen (27).

### Mit dem Stand der Technik verbundene Probleme

[0006] Transposon-basierte Vektoren haben sich als effiziente Werkzeuge zur Herstellung transgener Insekten für Forschungszwecke im Labormaßstab bewährt. Das dabei zugrundeliegende Mobilisierungsprinzip kann jedoch im industriellen Produktionsmaßstab gravierende Nachteile mit sich bringen, welche die Stabilität genomischer Transgen-Insertionen und, damit verbunden, Aspekte der Sicherheit potentiell freizusetzender gentechnisch veränderter Insekten betreffen.

Stabilität genomischer Transgen-Insertionen im industriellen Produktionsmaßstab

[0007] Transgene vermitteln dem transformierten Organismus einen Selektionsnachteil, zum einen aufgrund der Mutation am genomischen Transgen-Insertionslocus, zum anderen aufgrund der spezifisch von ihrer Nukleotidsequenz kodierten Gen-Produkte (Fälle, bei denen das Transgen selbst einen Positiv-Selektionsmarker darstellt, z.B. ein Pestizidresistenzgen, sind von dieser Feststellung ausgenommen). Der gentechnisch veränderte Organismus ist daher im Vergleich zum wildtypischen geschwächt und kann seine ursprüngliche Kompetitivität („fitness“) nur durch Selektion gegen das Transgen wiedererlangen. Eine Möglichkeit des Transgen-verlustes besteht in der Remobilisierung zu einem neuen genomischen Locus. Dies erfordert die Aktivität der zu den Zielstellen korrespondierenden Transposase. Zwar ist die im Prozeß der Keimbahntransformation eingesetzte Transposase in der Regel im Zielorganismus nicht genomisch kodiert, Kreuzreaktionen der Zielstellen mit artverwandten Transposasen sind jedoch möglich. Diese führen z.B. zu einer signifikanten Instabilität von Hermes-Transgen-Insertionen in hobo-haltigen *Drosophila*-Stämmen (28). Familien transposabler Elemente wie z.B. die mariner/Tel Superfamilie zählen viele Mitglieder (29), deren Kreuzmobilisierungspotential weitgehend unbekannt ist. Ein Herstellungsverfahren, das Remobilisierungen a priori ausschließt, ist daher wegen der gewährleisteten Transgen-Stabilität den heute verfügbaren KT-Methoden überlegen.

[0008] Untersuchungen zur Stabilität einer Transgen-Insertion bei der Insektenzucht in industriellem Maßstab liegen nach dem Erkenntnisstand des Autors bislang nicht vor. Stellvertretend dafür kann jedoch die Datenlage für klassisch genetisch selektierte und im industriellen Maßstab produzierte Insektenstämme betrachtet werden: So erwiesen sich z.B. Stämme der Mittelmeerfruchtfliege, die auf eine Translokation mit einem rezessiven Merkmal gezüchtet wurden (30) als nicht hinreichend stabil: Rekombinationseignisse mit der Folge der Revision des gezüchteten Merkmals traten mit einer Frequenz von  $10^{-3}$  –  $10^{-4}$  auf (31). Da das Merkmal dem Insekt einen selektiven Nachteil verleiht, setzten sich Reversionseignisse im Zuchstamm rasant durch und ließen diesen zusammenbrechen. Interessanterweise kam dieser Nachteil im kleinen Labormaßstab nicht zur Ausprägung, erwies sich dann aber bei der industriellen Anwendung als inakzeptabel. Erst erhebliche weitere Forschungsanstrengungen, die u.a. die Entwicklung eines aufwendigen (arbeits- und kostenintensiven) Qualitätssicherungs-Systems einschlossen (32), ermöglichen schließlich die erfolgreiche industrielle Zucht dieses Stammes im Produktionsmaßstab von  $10^6$  –  $10^7$  Individuen pro Woche (31).

Sicherheitsaspekte bei der Freisetzung gentechnisch modifizierter Insekten

[0009] Die industrielle Anwendung der Transgentechnologie schließt ausdrücklich die Freisetzung gentechnisch modifizierter Insekten ein. Daher kommt der Sicherheitsthematik eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zu (33). Sicherheit bedeutet in erster Linie, daß das Risiko der Transmission des Transgens auf andere pro- oder eukaryontische Spezies minimiert wird. Horizontaler Transgentransfer kann zwar per se nicht ausgeschlossen werden, da die Vielzahl an Mechanismen des Nukleinsäureaustauschs zwischen Spezies nicht hinreichend erforscht ist. Das Rest-Risiko dieser Transmissionsart ist jedoch um so geringer, je weniger mobile Transposon-DNA-Abschnitte im Anschluß an den Prozeß der KT im Genom zurückbleiben. Es ist die ausdrückliche Zielsetzung der in dieser Schrift offenbarten Transformationssysteme, einen wesentlichen Beitrag zur Minimierung dieses Rest-Risikos zu leisten. Dabei ist der Autor der festen Überzeugung, daß Transformationssysteme, die einen höheren Sicherheitsstandard gewährleisten, sich nicht nur durchsetzen werden, sondern sogar obligat werden für die Genehmigung kommerzieller Anwendungen auf diesem Gebiet, da ein erhöhter Sicherheitsstandard von regulatorischen Instanzen zur Norm erhoben werden wird.

Aufgabenstellung

Der Lösungsansatz: Post-transformationelle Immobilisierung von Transgenen

[0010] Aus den dargelegten Nachteilen des Stands der Technik ergibt sich die Notwendigkeit der Neukonzeption und Optimierung von KT-Systemen mit der Zielsetzung, eine stabile Verankerung von Transgen-DNS im Ziel-Genom zu ermöglichen. Die Herausforderung besteht also darin, ein Transformationssystem dergestalt zu konstruieren, daß eine Remobilisierung zuvor genomisch integrierter Transgene effizient unterbunden wird. Die hier offenbare Grundidee ist, die intakten, das Transgen flankierenden Transposase-Zielstellen post-transformationell zu entfernen. Im folgenden werden zwei Ausgestaltungen beschrieben, welche i.) Veränderungen der im Genom der Zielspezies integrierten Transgen-DNS zulassen; ii.) Veränderungen ermöglichen, die zur post-transformationellen Inaktivierung (mindestens) einer Zielstelle führen und iii.) diese Inaktivierung über physikalische Entfernung der Zielstellen-DNS-Sequenz aus dem Genom des transformierten Organismus vermitteln. Die erste hier offenbare Ausgestaltung, als „konditional exzisionskompetente Transformationsvektoren (Abb. 1)“ bezeichnet, basiert auf einem Transformationsvektor, der zusätzlich zu den gegenwärtig verwendeten eine von entgegengesetzten Rekombinase-Zielstellen eingerahmte Transposon-Halbseite trägt: Trans-

posonR'. Nach einer dem Stand der Technik entsprechenden Transposon-vermittelten KT (Schritt 1 in **Abb. 1**) und der Identifikation einer genomischen Transgen-Insertion wird die TransposonR'-DNS Rekombinase-vermittelt invertiert (Schritt 2 in **Abb. 1**). Diese Inversion ordnet die Halbseite zur stromabwärts liegenden Halbseite TransposonL dergestalt an, daß die zu den Zielstellen korrespondierende Transposase den von diesen Zielstellen eingeschlossenen DNS-Bereich remobilisieren kann. Erfolgreiche Transposase-vermittelte Remobilisierung und physikalische Deletion des Bereichs zwischen TransposonR' und TransposonL (Schritt 3 in **Abb. 1**) werden durch den Verlust des zweiten Transformationsmarkers (schräg gestrichelt markiert in **Abb. 1**) indiziert. Die Präsenz des ersten Transformationsmarkers (grau punktiert in **Abb. 1**) hingegen stellt sicher, daß eine mögliche Nebenreaktion, die Remobilisierung des gesamten Transgenkonstrukt (zwischen TransposonR und TransposonL), nicht stattgefunden hat. Im Ergebnis liegt eine Transgen-Insertion vor, die lediglich von einer einzigen Transposonhalbseite flankiert ist und infolgedessen immobilisiert und hinsichtlich enzymatischer Transposaseaktivität resistent gemacht worden ist.

[0011] Von dieser Ausgestaltung in den Einzelschritten grundsätzlich verschieden aber im Ergebnis sehr ähnlich ist ein Rekombinase-vermitteltes KT-System, das hier als „RMCE mit anschließender Transposondeletion (**Abb. 2**)“ bezeichnet wird. Hierbei wird die eigentliche KT nicht Transposase-, sondern Rekombinase-vermittelt durchgeführt, indem eine zu den heterospezifischen Zielstellen korrespondierende Rekombinase einen DNS-Kasettaustausch vornimmt: Eine erfolgreiche Reaktion wird durch den Austausch von Transformationsmarker 1 (grau punktiert in **Abb. 2**) gegen Transformationsmarker 2 (schräg gestrichelt markiert in **Abb. 2**) indiziert, wobei lediglich das offene Leseraster der beiden Markergene ausgetauscht wird (Schritt 1 in **Abb. 2**). Dies ist insofern bedeutsam, da das Markergen im RMCE-Donorplasmid promotorlos ist und infolgedessen genomische Integrationsereignisse des Donors, die nicht auf Kasettaustausch beruhen (Nebenreaktionen), unerkannt bleiben. Ein als „Zielsteuerungssequenz“ bezeichneter zwischen Akzeptor und Donor identischer DNS-Bereich erhöht die Effizienz der Paarung zwischen Akzeptor und Donor-DNS und damit die Wahrscheinlichkeit des RMCE. Dieses Prinzip, Transgene via RMCE effizient in das Genom von Zellen einzuschleusen, stellt eine völlig neuartige Methodik der Keimbahntransformation von Invertebraten dar und geht erheblich über den Stand bisher beschriebener RMCE-Technik (23, 24, 25) hinaus. Da über die Akzeptorkassette auch eine Transposon-Halbseitensequenz, TransposonR', einrekombiniert wird, wird nach erfolgtem DNS-Kasettaustausch eine „internes“ Transposon rekonstituiert, das ähnlich oben beschriebener Methodik Transposase-vermittelt mobilisiert werden kann (Schritt 2 in **Abb. 2**). Im Ergebnis liegt auch hier eine immobilisierte und daher stabile Transgen-Insertion vor.

#### Ausführungsbeispiel

##### Beispiel 1: Konditional exzisionskompetente Transformationsvektoren

[0012] Der Aufbau des konditional exzisionskompetenten Transformationsvektors, pBac\_STBL, sowie die experimentellen Schritte sind schematisch in **Abb. 3** dargestellt. Der Vektor pBac\_STBL wurde basierend auf dem Transposontyp „piggyBac“ (34) konstruiert. Klassische piggyBac-Transformationsvektoren (35, 36, 37) konstituieren sich aus piggyBac-Halbseiten oder Teilen davon, die ein Transformationsmarkergen sowie Klonierstellen für zu inserierende Transgen-DNS beinhalten. Als entscheidendes neu hinzugefügtes Merkmal trägt pBac STBL eine weitere piggyBacR'-Halbseite, die von entgegengesetzt-orientierten FRT (Flp Recombinase Target)-Zielstellen eingeschlossenen ist (siehe **Abb. 3**). piggyBacR' ist entgegengesetzt zur stromaufwärts liegenden piggyBacR-Halbseite orientiert, so daß eine Mobilisierung mit den außen liegenden piggyBac Enden mechanistisch nicht möglich sein sollte. Zudem enthält der Transformationsvektor zur Insertion von Transgen-DNS die Klonierstellen für die seltenen oktamerspezifischen Restriktionsenzyme Ascl und Fsel. pBac\_STBL ist mit zwei universellen Transformationsmarkergenen (38, 17) ausgestattet, von denen das eine (3xP3-EYFP; markiert „1“ in **Abb. 3**) stromaufwärts der Ascl/Fsel-Klonierstellen und das andere (3xP3-DsRed; markiert „2“ in **Abb. 3**) stromabwärts der FRT-Zielstellen liegt. Im folgenden sind die Details der Klonierungsschritte des finalen Transformationsvektors pBac STBL, zurückverfolgbar auf bereits publizierte Plasmide, offenbart:

pSL-3xP3-DsRedaf:

[0013] Im Plasmid pSL-3xP3-EGFPaf (36) wurde über Sall-NotI der kodierende Bereich für EGFP (0,7 kb) ausgeschnitten und das offene Leseraster von DsRed (0,8 kb), erhalten über Sall-NotI-Restriktion aus pDsRed I-1 (Clontech, Palo Alto, CA), kloniert.

pSLfaFRTfa:

[0014] Die FRT-Sequenz (90 bp) wurde über Sall-Asp718 aus pSL>AB> (39) präpariert und in das mit

Xhol-Asp718 geschnittene Plasmid pSLfa1180fa (36) kloniert. Die FRT-Sequenz entspricht dabei dem Substrat der Flp-Rekombinase nach (40):

TTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCTATTCTAGAAAGTATAGGAACCTCAGAGCGCTTTGAAGCT

pSL-3xP3-DsRed-FRT:

[0015] Das Plasmid pSLfaFRTfa wurde durch EcoRI-Asp718-Restriktion geöffnet. An diese Stelle wurde das EcoRI-BsiWI-Fragment (1,0 kb) aus pSL-3xP3-DsRedaf kloniert, das das DsRed-Leseraster unter 3xP3-Promotorkontrolle enthält.

pSL-3xP3-DsRed-FRT-FRT:

[0016] In das Plasmid pSL-3xP3-DsRed-FRT, geöffnet mit Bfrl-Spel, wurde das Bfrl-Spel nachgeschnittene PCR-Amplifikat der FRT-Sequenz (template: pSL>AB>; Oligonukleotid-Primer: CH\_FRT\_F 5'-GAG-CTTAAGGGTACCCGGGGATCTT-3' und CH\_FRT\_R 5'-GACTAGTCGATATCTAGGGCCGCCTAGCTTC-3') eingefügt. In diesem Vektor sind beide FRT-Sequenzen entgegengesetzt zueinander orientiert.

pSL-3xP3-DsRed-FRT-pBacR'-FRT:

[0017] Die 3' Halbseite der piggyBac Transposon-DNS, pBacR, wurde als 1,3 kb HpaI-EcoRV-Fragment aus dem Plasmid p3E1.2 (34) präpariert und in den mit EcoRV geöffneten Vektor pSL-3xP3-DsRed-FRT-FRT eingefügt. Die Insertion wurde in der Orientierung gewählt, in der die inserierte Halbseite entgegengesetzt zum DsRed-Leseraster steht. Eine EcoRV-Schnittstelle entsteht wieder am 5'-Ende der Insertionsstelle.

pBac STBL:

[0018] In den mit BgIII geöffneten (Schnittstelle mit Klenow-Enzym aufgefüllt) universellen Transformationsvektor pBac-3xP3-EYFPaf (36) wurde das 2,7 kb EcoRI-Bfrl-Fragment (beide Schnittstellen aufgefüllt) aus dem Plasmid pSL-3xP3-DsRed-FRT-pBacR'-FRT eingesetzt. Die Insertion wurde in der Orientierung gewählt, in der das DsRed-Gen entgegengesetzt zur Leserichtung des EYFP-Gens steht. In diesem Vektor steht die zusätzlich eingefügte, zweite piggyBac-Halbseite, pBacR', in entgegengesetzter Orientierung zur stromaufwärts des EYFP-Gens liegenden pBacR-Sequenz (siehe **Abb. 3**).

[0019] Da in pBac\_STBL beide Transformationsmarkergene mit entgegengesetzten SV40polyA-Sequenzen ausgestattet sind, ist die Plasmidamplifikation im Wirt *E. coli* erschwert. Daher wurden in hier nicht weiter beschriebenen Varianten des finalen Vektors die SV40polyA-Sequenz des EYFP-Gens gegen polyA-Sequenzen anderer Gene ausgetauscht.

Helperplasmid:

[0020] Das zur KT mit pBac\_STBL verwendete Helperplasmid, phspBac ist publiziert in (35).

Experimentelle Schritte zur Transgenimmobilisierung (siehe **Abb. 1** und **Abb. 3**)

a.) Keimbahntransformation von pBac STBL (Schritt 1 in **Abb. 1** und **Abb. 3**)

[0021] Der von piggyBacR und piggyBacL-Enden eingeschlossene DNS-Bereich in pBac\_STBL (bzw. Transgen-beladener Derivate dieses Vektors) wird mittels piggyBac-vermittelter Keimbahntransformation (35, 36) ungerichtet im *Drosophila*-Genom (in Zellen der Keimbahn) integriert.

b.) Flp-Rekombinase-induzierte Inversion (Schritt 2 in **Abb. 1** und **Abb. 3**)

[0022] Genomische Transgen-Insertionen sind aufgrund der EYFP und DsRed-Augenfluoreszenz identifizierbar (36, 17). Der Etablierung bzgl. der Transgen-Insertion homozygoter *Drosophila*-Linien schließt sich der Schritt der Flp-Rekombinase-induzierten Inversion des von entgegengesetzten orientierten FRTs eingeschlossenen DNS-Bereichs an: Dies kann durch Einkreuzen des  $\beta$ 2t-FLP-Stammes geschehen (41), der die Flp-Rekombinase während der Spermatogenese exprimiert. Auf alternative Möglichkeiten dieses Schrittes, z.B. die Verwendung von hsp70-FLP bzw. hsFLP-Stämmen (41) oder von Khsp82-FLP-Stämmen oder die Mikroinjektion des Flp-Rekombinasekodierende Plasmids pKhsp82-FLP (siehe S. 11) in Präblastodermembryonen der bzgl. der Transgen-Insertion homozygot etablierten Linien sei explizit hingewiesen. Das Inversionsereignis selbst kann aufgrund der Markerausstattung der pBac\_STBL-Vektoren nicht identifiziert werden, jedoch ist auf-

grund der hohen Flp-Rekombinase-Aktivität die Einstellung eines statistischen Gleichgewichts zwischen Ausgangszustand und Inversion anzunehmen.

c.) piggyBac-Transposase induzierte Deletion (Schritt 3 in **Abb. 1** und **Abb. 2**)

[0023] Linien mit potentiell invertierten Transgen-Insertionen werden mit einem piggyBac-Transposaseexprimierenden, sog. „Jumpstarter“-Stamm gekreuzt. Hierzu eignet sich z.B. der Drosophila Stamm Her{3xP3-ECFP, *atub*-piggyBacK10} (42). Nachkommen dieser Kreuzung, die sowohl EYFP/DsRed-(indikativ für pBac\_STBL) als auch ECFP-Augenfluoreszenz (indikativ für den Jumpstarter) zeigen, werden einzeln ausgekreuzt.

d.) Identifizierung immobilisierter Transgen-DNA

[0024] ECFP- Nachkommen (Selektion gegen den Jumpstarter) dieser Einzelkreuzungen werden auf das Vorhandensein von EYFP-Fluoreszenz bei gleichzeitiger Abwesenheit von DsRed-Fluoreszenz hin analysiert. Individuen mit einem Exzisionsereignis (EYFP<sup>+</sup> aber DsRed<sup>-</sup>) können dann weiter untersucht werden: Mittels inverser PCR wird bestätigt, daß tatsächlich nur der rekonstituierte Transposonbereich (zwischen pBacR' und pBacL, siehe **Abb. 3**) durch die piggyBac-Transposase entfernt worden ist, mittels erneuter Konfrontation mit piggyBac-Transposase kann die Stabilität der Insertion getestet werden.

Beispiel 2: RMCE mit anschließender Transposonexzision

[0025] Der Aufbau der RMCE-Vektoren (Donor und Akzeptor) sowie die experimentellen Schritte sind schematisch in **Abb. 4** dargestellt. Der RMCE-Akzeptorvektor, pBac{3xP3-FRT-ECFP-linotte-FRT3}, ist ein piggyBac-basierter Transformationsvektor, der als neu hinzugefügtes Merkmal eine DNS-Austauschkassette enthält. Diese Kassette baut sich aus zwei gleich-orientierten aber heterospezifischen FRT-Zielstellen auf (FRT und FRT3 entsprechend F und F3 nach (23)), die das ECFP-offene Leseraster und eine Zielsteuerungssequenz einrahmen. Als Zielsteuerungssequenz wurde das 1,6 kb genomische HindIII-Fragment des Drosophila linotte-Locus gewählt, welches als „Köder“ für die Anlagerung von DNS-Duplexen mit gleicher Sequenz fungiert (43). Die Positionierung einer FRT-Zielstelle zwischen 3xP3-Promotor und dem Start der ECFP-kodierenden Region interferiert nicht mit der Expression des 3xP3-ECFP-Gens (44). Der RMCE-Donorvektor hingegen, pSL-FRT-EYFP-pBacR'-3xP3-DsRed-linotte-FRT3, enthält die einzurekombinierende DNS-Kassette aus heterospezifischen FRT-Zielstellen, die das EYFP-offene Leseraster (promotorlos!), die piggyBacR'-Halbseite, das Transformationsmarken 3xP3-DsRed sowie die zum RMCE-Akzeptor identische linotte-Zielsteuerungssequenz einrahmen. Der RMCE-Donorvektor ist ein Kloniervektor auf Basis des pSLfa1180fa (36), der, abgesehen von der piggyBacR'-Sequenz, keine Transposonsequenzen enthält. Ascl/Fsel-Klonierstellen zur Insertion von Transgenen sind stromaufwärts der piggyBacR'-Sequenz eingefügt.

Anwendungspotential der RMCE-Technologie in Invertebraten

[0026] Die in dieser Schrift für einen Invertebraten-Organismus (*Drosophila melanogaster*) etablierte DNS-Kasettenaustausch-Technologie stellt ein äußerst vielseitiges Werkzeug dar, das über das hier fixierte Ziel der Immobilisierung von Transgenen hinausgehend Anwendungspotential besitzt: RMCE ermöglicht generell in Invertebraten, DNS-Kassetten, die Transgene tragen, gezielt an einen genomischen Locus einzusetzen. Dieser Locus ist durch die genomische RMCE-Akzeptorintegration definiert und kann molekular und hinsichtlich des lokalen Gen-Expressionsmusters (Aktivität von regulatorischen Elementen an diesem Locus) vor dem RMCE-Experiment charakterisiert werden. Somit besteht die Möglichkeit, sich unter vielen verschiedenen bzgl. des RMCE-Akzeptors transgenen Linien diejenige auszuwählen, welche das für den jeweiligen Anwendungszweck geeignete Expressionsmuster hat (hinsichtlich Stärke, Zelltyp- und Entwicklungsstadien-Spezifität). Der Kasettenaustausch kann darüber hinaus repetitiv vorgenommen werden, d.h. eine Transgenkassette in einem Insektenstamm mit bestimmtem genetischen Hintergrund kann wiederholt gegen eine weitere Transgenkassette, ausgetauscht werden. Zudem können über diese Technologie verschiedene Transgene an denselben Locus gebracht werden. Dies ermöglicht komparative Studien verschiedener Transgene im gleichen genomischen Kontext unter Ausschluß von Positionseffekten.

[0027] Im folgenden sind die Details der Klonierungsschritte der RMCE-Vektoren, zurückverfolgbar auf bereits publizierte Plasmide, offenbart:

Klonierung des RMCE-Akzeptorvektors:

pSL-3xP3-FRT-ECFPaf:

[0028] Das die FRT-Sequenz enthaltende 90 bp Sall-Asp718 Fragment wurde aus dem Plasmid pSL>AB> (39) isoliert und in das mit Sall-Asp718 geschnittene Plasmid pSL-3xP3-ECFPaf (36) eingesetzt. Die FRT-Sequenz entspricht dabei dem Substrat der Flp-Rekombinase nach (40):

TTGAAPGTTCCATTCCGAAGTTCCATTCTAGAAAGTATAGGAACCTCAGAGCGTTTGAAGCT

pBac {3xP3-FRT-ECFPaf}:

[0029] Das 1,3 kb EcoRI-Nrul Fragment wurde aus dem Plasmid pSL-3xP3-FRT-ECFPaf isoliert und nach Auffüllen der Schnittstellen in das Plasmid p3E1.2 (34) eingesetzt, das mit HpaI geschnitten wurde.

pBac{3xP3-FRT-ECFP-linotte-FRT3}, finaler RMCE-Akzeptorvektor:

[0030] Das Plasmid pBac {3xP3-FRT-ECFPaf} wurde mit Ascl-BglII geöffnet. In diesen linearisierten Vektor wurden kloniert:

i.) das mit Ascl-Asp718 geschnittene PCR-Amplifikat des 1,6 kb HindIII genomischen linotte-Fragmentes (43). Als „template“ wurde genomische DNS von Drosophila melanogaster, Stamm OregonR verwendet und als Oligonukleotidprimer:

CH\_lioFwd(5'-TTGGCGCGCCAAAAGCTTCTGTCTCTTTCTG-3') und

CH\_lioRev(5'-CGGGGTACCCCAAGCTTATTAGAGTAGTATTCTTC-3')

und

ii.) das mit Asp718-BglII geschnittene, über mutagene PCR erhaltene Amplifikat der FRT3-Sequenz.

[0031] Als template wurde das Plasmid pSL>AB> (39) verwendet und als Oligonukleotidprimer CH\_F3Fwd (5'-TTGGCGCGCCAAGGGGTACCCGGGGATCTG-3') und CH\_F3Rev (5'-CCGCTCGAGCGGAAGATCTG-AAGTTCCCTATACTATTGAAGAATAG-3').

[0032] Die FRT3-Sequenz entspricht der F3-Sequenz in (23):

TTGAAGTTCCATTCCGAAGTTCCATTCTtcAaAtAGTATAGGAACCTCAGAGCGC

Klonierung des RMCE-Donorvektors

pSL-3xP3-FRT-EYFPaf:

[0033] Analog zu pSL-3xP3-FRT-ECFPaf aber durch Klonierung in pSL-3xP3-EYFPaf (36).

pSL-FRT-EYFPaf

[0034] Aus dem Plasmid pSL-3xP3-FRT-EYFPaf wurde mit EcoRI-BamHI der 3xP3-Promotor herausgeschnitten, die überstehenden Enden aufgefüllt und der Vektor religiert.

pSL-FRT-EYFP-linotte-FRT3:

[0035] Das 1,7 kb Ascl-BglII (beide Enden aufgefüllt)-Fragment aus pBac {3xP3-FRT-ECFP-linotte-FRT3} wurde in den mit Nrul geöffneten Vektor pSL-FRT-EYFPaf eingesetzt. Die Orientierung wurde derart gewählt, daß die Zielstellen FRT und FRT3 maximalen Abstand zueinander einnehmen.

pBac {3xP3-DsRedaf}

[0036] Das 1,2 kb EcoRI (Ende aufgefüllt)-Nrul Fragment wurde aus pSL-3xP3-DsRedaf präpariert und in das Plasmid p3E1.2 (34) kloniert, das mit HpaI-BglII (Ende aufgefüllt) geschnitten wurde.

pSL-FRT-EYFP-pBacR-3xP3-DsRed-linotte-FRT3, finaler RMCE-Donorvektor:

[0037] Das 2,5 kb EcoRV-Ascl (Enden aufgefüllt) Fragment wurde aus pBac{3xP3-DsRedaf} präpariert und in das Plasmid pSL-FRT-EYFP-linotte-FRT3 kloniert, das mit EcoRI (Enden aufgefüllt) geöffnet wurde.

## Plasmidale Flp-Rekombinase-Quelle

## pKhsp82-FLP:

[0038] Das das Flp-Rekombinase-offene Leseraster und die 3' regulatorische Sequenz des adh-Gens enthaltende 2,2 kb Asp718-XbaI Fragment wurde aus dem Konstrukt pFL124 (Geschenk von G. Struhl) isoliert und die Schnittstellen aufgefüllt. Das Fragment wurde anschließend in das mit BamHI (Enden aufgefüllt) linearisierte Konstrukt pKhsp82 (Geschenk von P. Atkinson) kloniert.

## Helperplasmid:

[0039] Das zur KT des RMCE-Akzeptors verwendete Helperplasmid, phspBac, ist publiziert in (35).

Effizienz des DNS-Kasettenaustauschs (RMCE) im Genom von *Drosophila melanogaster*

[0040] Die zentrale Voraussetzung für die praktische Anwendung eines RMCE-basierten KT-Systems zur Immobilisierung von Transgenen ist eine Effizienz des DNS-Kasettenaustausch in der Größenordnung der konventionellen KT, bei der Transgeninsertionen unter  $10^3$ - $10^4$  F<sub>1</sub>-Nachkommen identifizierbar sind. Da bisherige Versuche zum DNS-Kasettenaustausch in Zellkultur unter Selektionsbedingungen durchgeführt wurden (21, 22), ist die Effizienz im *Drosophila*-System ohne Selektionsbedingungen schwer vorherzusagen. Daher wurde ein Pilotexperiment durchgeführt: In Präblastodermembryonen von vier bzgl. des RMCE-Akzeptors, pBae{3xP3-FRT-ECFP-linotte-FRT3}, homozygot transgenen *Drosophila melanogaster* Linien (ECFP-Augenfluoreszenz) wurden die Zwischenstufe des RMCE-Donorvektors, pSL-FRT-EYFP-linotte-FRT3, sowie das Flp-Rekombinase-exprimierende Plasmid, pKhsp82-FLP, injiziert. Die finale Konzentration im Injektionsmix betrug 500 ng/µl für den RMCE-Donor und 300 ng/µl für pKhsp82-FLP. Insgesamt wurden ca. 3000 *Drosophila*-Embryonen injiziert, dem Zehnfachen einer üblichen piggyBac-vermittelten KT entsprechend. Der Erfolg des DNS-Kasettenaustauschs wird in der ersten Filialgeneration durch den Wechsel der Augenfluoreszenz von ECFP nach EYFP indiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt:

RMCE-Akzeptorlinie	injizierte Embryonen	Injektions-überlebende ♂	fertile ♂	davon mit EYFP Nachkommen (ECFP)
M4.II	750	121	70	22
M7.III	750	138	72	17
M8.II	600	68	54	12
M9.II	750	123	109	27

**Tab.1:** Injektion des RMCE-Donorvektors pSL-FRT-EYFP-linotte-FRT3 in vier bzgl. des RMCE-Akzeptors homozygote *Drosophila* Linien. Die Anzahl injizierter Embryonen, daraus sich entwickelnder adulter Nachkommen (überlebend und fertil) sowie die Anzahl der Auskreuzungen, die EYFP-Nachkommen hervorbrachten (indikativ für DNA-Kasettenaustausch) sind angegeben.

[0041] Definiert man die DNS-Kasettenaustausch-Effizienz analog zur Transformationseffizienz mit Transposon-basierten Vektoren als Verhältnis der Ansätze in F<sub>1</sub> mit Austauschereignissen (hier: EYFP+) zur Gesamtzahl der Ansätze, so liegt diese im Durchschnitt bei 25 %. Dies entspricht der *Drosophila* KT-Effizienz mit piggyBac, Hermes oder Minos-basierten Transformationsvektoren. Mit diesem Pilotexperiment konnte der Nachweis erbracht werden, daß die wesentliche Voraussetzung für RMCE-basierte KT-Systeme, nämlich eine hohe Kasettenaustausch-Effizienz, gegeben ist.

Experimentelle Schritte zur Transgenimmobilisierung (siehe **Abb. 2** und **Abb. 4**)a.) Keimbahntransformation des RMCE-Akzeptorvektors (nicht gezeigt in **Abb. 2** und **Abb. 4**)

[0042] pBac{3xP3-FRT-ECFP-linotte-FRT3} wird mittels piggyBac-vermittelter Keimbahntransformation (35, 36) ungerichtet im *Drosophila*-Genom (in Zellen der Keimbahn) integriert. Der KT schließt sich die Etablierung bzgl. des Akzeptors homozygoter transgener Linien an.

b.) Gerichteter DNS-Kasettenaustausch (RMCE, Schritt 1 in **Abb. 2** und **Abb. 4**)

[0043] Analog zum oben beschriebenen Pilotexperiment wird das Donorkonstrukt, pSL-FRT-EYFP-pBacR-3xP3-DsRed-linotte-FRT3, oder Transgen-beladene Derivate dieses Vektors zusammen mit dem Flp-Rekombinase exprimierenden Plasmid koinjiziert in bzgl. des Akzeptors homozygot transgene Embryonen. Überlebende Männchen werden ausgekreuzt und die Nachkommenschaft (F<sub>1</sub>-Generation) auf das Auftreten von Individuen mit vorhandener EYFP-(markiert „1“ in **Abb. 4**) und DsRed-(markiert „2“ in **Abb. 4**) bei gleichzeitigem Fehlen von ECFP- (markiert „3“ in **Abb. 4**) – Augenfluoreszenz durchgemustert. Dieses Fluoreszenzmuster indiziert einen erfolgreichen DNS-Kasettenaustausch.

c.) piggyBac-Transposase induzierte Deletion (Schritt 2 in **Abb. 2** und **Abb. 4**)

[0044] Nach dem Kasettenaustausch liegt ein rekonstituiertes internes piggyBac-Transposon vor, das piggyBac-Transposase-vermittelt remobilisiert werden kann (vgl. S.8, Schritt c.)). Die erfolgreiche Remobilisierung wird durch den Verlust des DsRed-Transformationsmarkergens (markiert „2“ in **Abb. 4**) angezeigt: Nachkommen mit einer immobilisierten Transgen-Insertion zeigen ausschließlich EYFP-(markiert „1“ in **Abb. 4**)-Fluoreszenz. Abschließend können die physikalische Deletion des Transposons auf molekularer Ebene über inverse PCR und die Stabilität der Insertion durch erneutes Einkreuzen von piggyBac-Transposase bestätigt werden.

#### Vorteile der Erfindung

[0045] Die Vorteile beider KT-Systeme gegenüber konventionellen liegen auf der Hand: Aufgrund der physikalischen Deletion transponierbarer DNS-Abschnitte, sind Transposase-vermittelte Kreuzmobilisierungseignisse mechanistisch ausgeschlossen. Gegenüber konventionellen Transgen-Insertionen weist eine dergestalt immobilisierte Insertion eine erhöhte Stabilität auf. Des weiteren betrifft der post-transformationelle Modifikationsprozeß in beiden Ausgestaltungen der Erfindung nur den DNS-Bereich des Transgenvektors und hat ansonsten keinerlei Veränderung im Genom zur Folge. Zudem werden am Modifikationsprozeß beteiligte DNS-Werkzeuge (Transformationsmarker, Transposase- oder Rekombinase-Zielstellen) im letzten experimentellen Schritt (siehe Schritt 3 in **Abb. 1** und Schritt 2 in **Abb. 2**) größtenteils wieder entfernt, so daß final keine durch Transposasen oder Rekombinasen mobilisierbaren Bereiche im Genom zurückbleiben. Die konkrete Ausgestaltung der hier offenbarten KT-Systeme ist weder von der Natur des verwendeten Transposontyps, noch von der Natur der Transformationsmarkergene, noch von der Natur des ortsspezifischen Rekombinationssystems, noch von der Natur der Zielsteuerungssequenz abhängig. Darüberhinaus besitzen beide Ausgestaltungsbeispiele generelles Anwendungspotential in Invertebraten-, insbesondere in Arthropodenspezies, da ausschließlich spezies-unabhängige Komponenten (Breitband-Transposons, universelle Transformationsmarker, heterologe ortsspezifische Rekombinationssysteme) verwendet werden.

#### Verzeichnis zitierter Druckschriften

1. Engels, W.R. (1996). P Elements in Drosophila. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204, 103-123.
2. Rio, D.C. & Rubin, G.M. (1988). Identification and purification of a Drosophila protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the P transposable element. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8929-8933.
3. Atkinson, P.W. & James, A.A. (2002). Germline transformants spreading out to many insect species. Adv. Genet. 47, 49-86.
4. United States Patent No. US 6,218,185 B1
5. United States Patent No. US 5,614,398
6. European Patent No. EP 0 955 364 A3
7. Patent Cooperation Treaty PCT WO 99/09817
8. Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T.G., Blass, C., Savakis, C., Kafatos, F.C. & Crisanti, A. (2000). Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. Nature 405, 959-962.
9. Allen, M.L., O'Brochta, D.A., Atkinson, P.W. & Levesque, C.S. (2001). Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). J. Med. Entomol. 38, 701-710.
10. Coates J.C., Jasinskiene, N., Miyashiro, L. & James, A.A. (1998). Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3748-3751.
11. Jasinskiene, N., Coates, C.J., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Rafferty, C.S., James, A.A. & Collins, F.H. (1998). Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3743-3747.
12. Loukeris, G.T., Livadaras, I., Arca, B., Zabalou, S. & Savakis, C. (1995). Gene transfer into the Medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable Element. Science 270, 2002-2005.

13. Tamura, T. et al. (2000). Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18, 81-84.
14. Bessereau, J.-L., Wright, A., Williams, D.C., Schuske, K., Davis, M.W. & Jorgensen, E.M. (2001). Mobilization of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Nature* 413, 70-74.
15. Fadool J.M., Hartl, D.L. & Dowling, J.E. (1998). Transposition of the mariner element from *Drosophila* mauritiana in Zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5182,5186.
16. Sherman, A., Dawson, A., Mather, C., Gilhooley, N., Li, Y., Mitchell, R., Finnegan, D. & Sang, H. (1998). Transposition of the *Drosophila* element mariner into the chicken germ line. *Nat. Biotechnol.* 16, 1050-1053.
17. Horn, C., Schmid, B.G.M., Pogoda, F.S. & Wimmer, E.A. (2002). Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1221-1235.
18. zur Patentsituation von GFP und Derivaten sowie DsRed siehe [www.clontech.com](http://www.clontech.com).
19. Patent Cooperation Treaty PCT WO 01/14537 A1
20. Patent Cooperation Treaty PCT WO 01/12667 A1
21. Baer, A. & Bode, J. (2001). Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr Opin Biotechnol.* 12, 473-480.
22. Kolb, A.F. (2002). Genome engineering using site-specific recombinases. *Cloning Stem Cells.* 4, 65-80.
23. Schlake, T. & Bode, J. (1994). Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33, 12746-12751.
24. Seibler, J., Schübeler, D., Fiering, S., Groudine, M. & Bode, J. (1998). DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry* 37, 6229-6234.
25. European Patent No. EP 0 939 120 A1.
26. Kolb, A.F. (2001). Selection-marker-free modification of the murine beta-casein gene using a lox2272 [correction of lox2722] site. *Anal Biochem.* 290, 260-271.
27. siehe Patentansprüche #1-11 in EP 0 939 120 A1.
28. Sundararajan, P., Atkinson, P.W. & O'Brochta, D.A. (1999). Transposable element interactions in insects: crossmobilization of hobo and Hermes. *Insect Mol. Biol.* 8, 359-368.
29. Hartl, D.L., Lohe, A.R. & Lozovskaya, E.R. (1997). Modern thoughts on an acentric mariner: function, evolution, regulation. *Annu. Rev. Genet.* 31, 337-358.
30. Franz, G., Gencheva, E. & Kerremans, Ph. (1994). Improved stability of genetic sex-separation strains for the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genome* 37, 72-82.
31. Franz, G. (2002). Transgenic arthropods and the sterile insect technique. in preperation.
32. Fisher, K. & Caceres, C. (2000). A filter rearing system for mass reared medfly, S. 543-550 in Area-wide control of fruit flies and other insect pests, Hrsg.: Tan, K.H., Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia.
33. Tappeser, B. & Baier, A. (2000). Transgenic arthropods. *Genetic Engineering Newsletter – Special Issue 4.* Hrsg.: Öko-Institut, Institut für angewandte Ökologie e.V., Freiburg, Berlin, Darmstadt, Deutschland.
34. Cary, L.C., Goebel, M., Corsaro, B.G., Wang, H.G., Rosen, E. & Fraser, M.J. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172, 156-169.
35. Handler, A.M. & Harrell, R.A. (1999). Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol. Biol.* 8, 449-457.
36. Horn, C. & Wimmer, E.A. (2000). A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev. Genes Evol.* 210, 630-637.
37. Handler, A.M. (2002). Use of the piggyBac transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1211-1220.
38. Horn, C., Jaunich, B. & Wimmer, E.A. (2000). Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev. Genes Evol.* 210, 623-629.
39. Wimmer, E.A., Cohen, S.M., Jäckle, H. & Desplan, C. (1997). Buttonhead does not contribute to a combinatorial code proposed for *Drosophila* head development. *Development* 124, 1509-1517.
40. Jayaram M. (1985). Two-micrometer circle site-specific recombination: The minimal substrate and the possible role of flanking sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5875-5879.
41. Golic, M.M., Rong, Y.S., Petersen, R.B., Lindquist, S.L. & Golic, K.G. (1997). FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 25, 3665-3671.
42. Horn, C., Offen, N., Nystedt, S., Häcker, U. & Wimmer, E.A. (2003). piggyBac-based insertional mutagenesis and enhancer detection as a tool for functional insect genomics. in press
43. Taillebourg, E. & Dura, J.M. (1999). A novel mechanism for P element homing in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6856-6861.
44. Horn, C. (1999). Entwicklung universeller Transformationsvektoren zur genetischen Manipulation von Insekten. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

**Patentansprüche**

1. Eine Methode der Generierung einer vererbaren Integration von DNS im Genom der Keimbahnzellen und im Genom der somatischen Zellen eines Invertebraten-Organismus, wobei die Integration homologe oder heterologe DNS-Sequenzen oder homologe oder heterologe Gene (Transgene) oder die Kombination aus beidem enthält, dadurch gekennzeichnet, daß mittels eines posttransformationellen, d.h. sich an eine Keimbahntransformation anschließenden Modifikationsprozesses der besagten Integration DNS-Sequenzen, die definierte Zielstellen für Transposase- oder Rekombinase-Enzyme tragen und ursprünglich aus dem Transformationsvektor stammen, physikalisch aus besagtem Genom entfernt werden.

2. Die Methode nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im Verlauf des besagten Modifikationsprozesses, vermittelt durch die Wirkung einer ortsspezifischen Rekombinase, ein Transposase-mobilisierbarer DNS-Bereich rekonstituiert wird. Der rekonstituierte DNS-Bereich besteht dabei aus zwei Transposon-Halbseiten, TransposonL und TransposonR, die funktionelle DNS-Sequenzen wie einen Transformationsmarker oder eine Rekombinase-Zielstelle einschließen und die invertierten terminalen Sequenzwiederholungen als Zielstellen der korrespondierenden Transposase in einer Anordnung tragen, daß eine Transposase-gesteuerte Exzision ermöglicht wird.

3. Die Methode nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Generierung besagter DNS-Integration einen DNS-Kasettenaustausch im Genom der Keimbahnzellen des Organismus beinhaltet mit den folgenden Schritten:

a.) Integration einer ersten DNS-Kassette (DNS-Akzeptorkassette) an einem chromosomal Locus des Genoms besagter Zellen, wobei die DNS-Akzeptorkassette, flankiert von einer wildtypischen Rekombinase-Zielstelle an einem Ende und einer modifizierten heterospezifischen Rekombinase-Zielstelle an dem anderen Ende, ein Transformationsmarkergen zur Markierung und eine DNS-Sequenz zur Anlagerung homologer DNS-Sequenzen an den chromosomal Locus (Zielsteuerungssequenz) trägt,

b.) Etablierung bzgl. der DNS-Akzeptorkassette homozygot transgener Linien des Organismus

c.) Austausch der besagten DNS-Akzeptorkassette gegen eine einzurekombinierende zweite DNS-Kassette, vermittelt durch die Wirkung einer ortsspezifischen Rekombinase, wobei die DNS-Donorkassette auf einem zirkulären Vektor lokalisiert ist und ein oder mehrere Transgene sowie eine Transposon-Halbseite trägt, welche durch dieselben Rekombinase-Zielstellen wie in besagter DNS-Akzeptorkassette flankiert sind und weiter dadurch gekennzeichnet,

daß nach erfolgtem DNS-Kasettenaustausch ein Transposase-mobilisierbarer DNS-Bereich rekonstituiert wird, welcher, vermittelt durch die Wirkung der zu den Zielstellen korrespondierenden Transposase, mobilisiert und damit physikalisch aus dem Genom besagter Zellen entfernt werden kann.

4. Die Methode nach den Patentansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte ortsspezifische Rekombinationssystem das Flp/FRT (Flp := Fip-Rekombinase und FRT := Fip-Rekombinase-Zielstellen) oder das Cre/loxP (Cre := Cre-Rekombinase / loxP := Cre-Rekombinase-Zielstellen) sind.

5. Die Methode nach den Patentansprüchen 1, 3, und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte wildtypische Rekombinase-Zielstelle in der DNS-Akzeptorkassette zwischen Promotor (inklusive regulatorischer DNS-Sequenzen) und offenem Leseraster des Transformationsmarkergens lokalisiert ist und das auf die besagte wildtypische Rekombinase-Zielstelle in der DNS-Donorkassette folgende Transformationsmarkergen promotorlos ist.

6. Die Methode nach den Patentansprüchen 1 und 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte wildtypische Rekombinase-Zielstelle eine FRT- oder eine loxP-Zielstelle ist und die besagte heterospezifische Rekombinase-Zielstelle eine FRT- oder eine loxP-Zielstellenmutante ist.

7. Die Methode nach den Patentansprüchen 1 bis 3 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Transformationsmarkergene sich aus einem evolutionär konservierten Promotor und einem phänotypisch dominanten Markergen für ein fluoreszierendes Protein zusammensetzen.

8. Die Methode nach den Patentansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Transposontypen und korrespondierende Transposasen eine der Breitband-Transposons piggyBac, Hermes, Minos oder Mariner sind.

9. Die Methode nach den Patentansprüchen 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Zielsteuerungssequenz die sie enthaltenden Keimbahn-Transformationsvektoren mit signifikant erhöhter Wahrscheinlichkeit

lichkeit den chromosomalen Locus des parentalen Gens der Zielsteuerungssequenz ansteuern läßt

10. Die Methode nach den Patentansprüchen 1, 3 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Zielsteuerungssequenz die Sequenz oder Teile der Sequenz des *Drosophila melanogaster* *linotte*-Gens oder zu diesem homologer Gene ist.

11. Gentechnisch veränderte Invertebraten-Organismen, die nach einer Methode nach den Patentansprüchen 1 bis 10 hergestellt wurden.

12. Ein gentechnisch veränderter Organismen nach Patentanspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus ein Insekt ist und aus der folgenden Gruppe von Insekten ausgewählt wurde:

*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*, *Glossina* spp., *Lucilia cuprina*, *Dacus dorsalis*, *Dacus oleae*, *Dacus cucurbitae*, *Dacus zonatus*, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis rosa*, *Aleurocanthus woglumi*, *Rhagoletis cerasi*, *Bactrocera tryoni*, *Anastrepha suspensa*, *Solenopsis richteri*, *Solenopsis invicta*, *Lymantria dispar*, *Cydia pomonella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Cochliomyia hominivorax*, *Chrysomyia bezziana*, *Anthonomous grandis*, *Enallagma hageni*, *Libellula luctuosa* und *Tryporyza incertulas* *Popilla japonica*, *Graptognathus* spp., *Drosophila melanogaster*.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Abb. 1:

## Konditional exzisionskompetente Transformationsvektoren

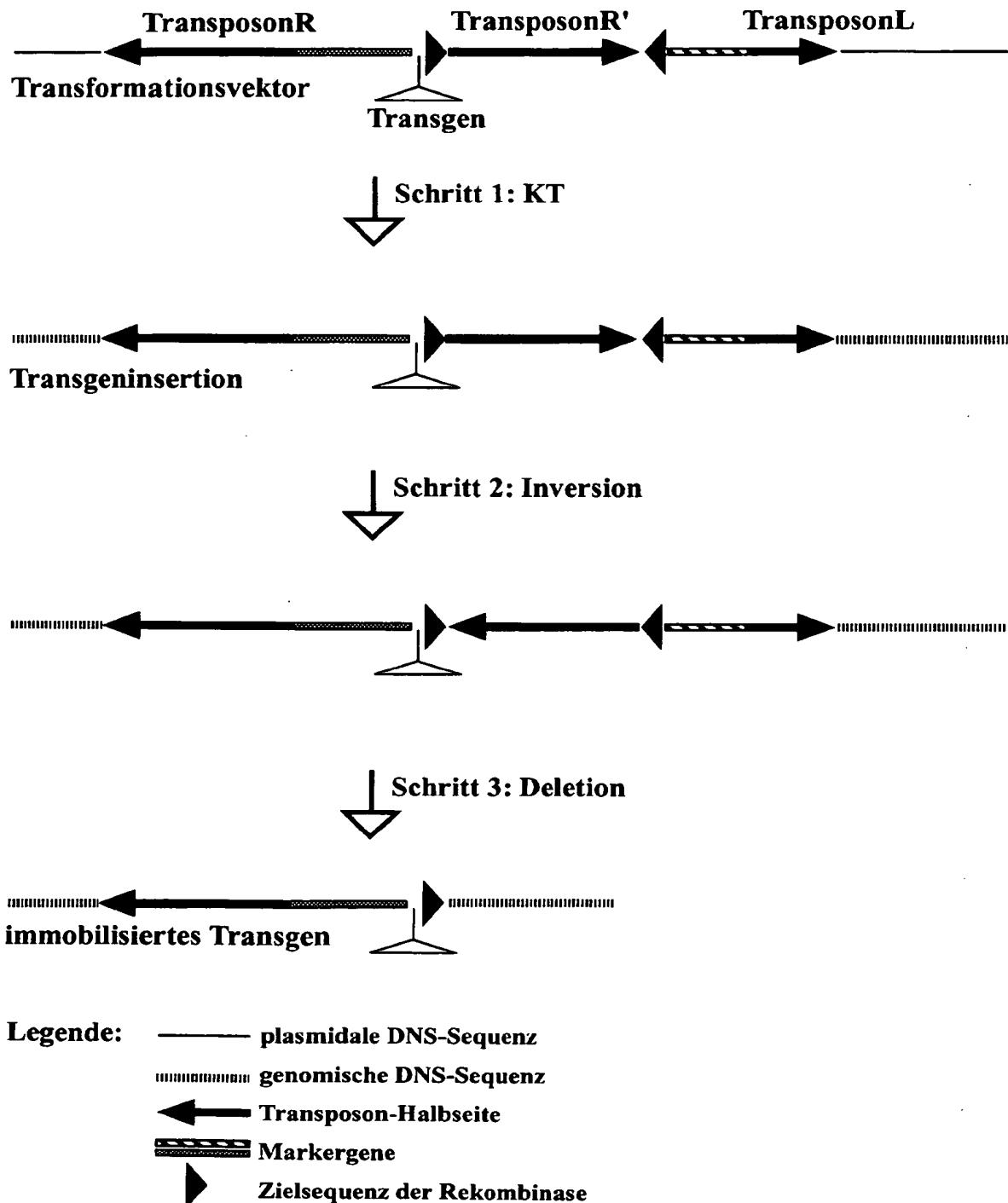
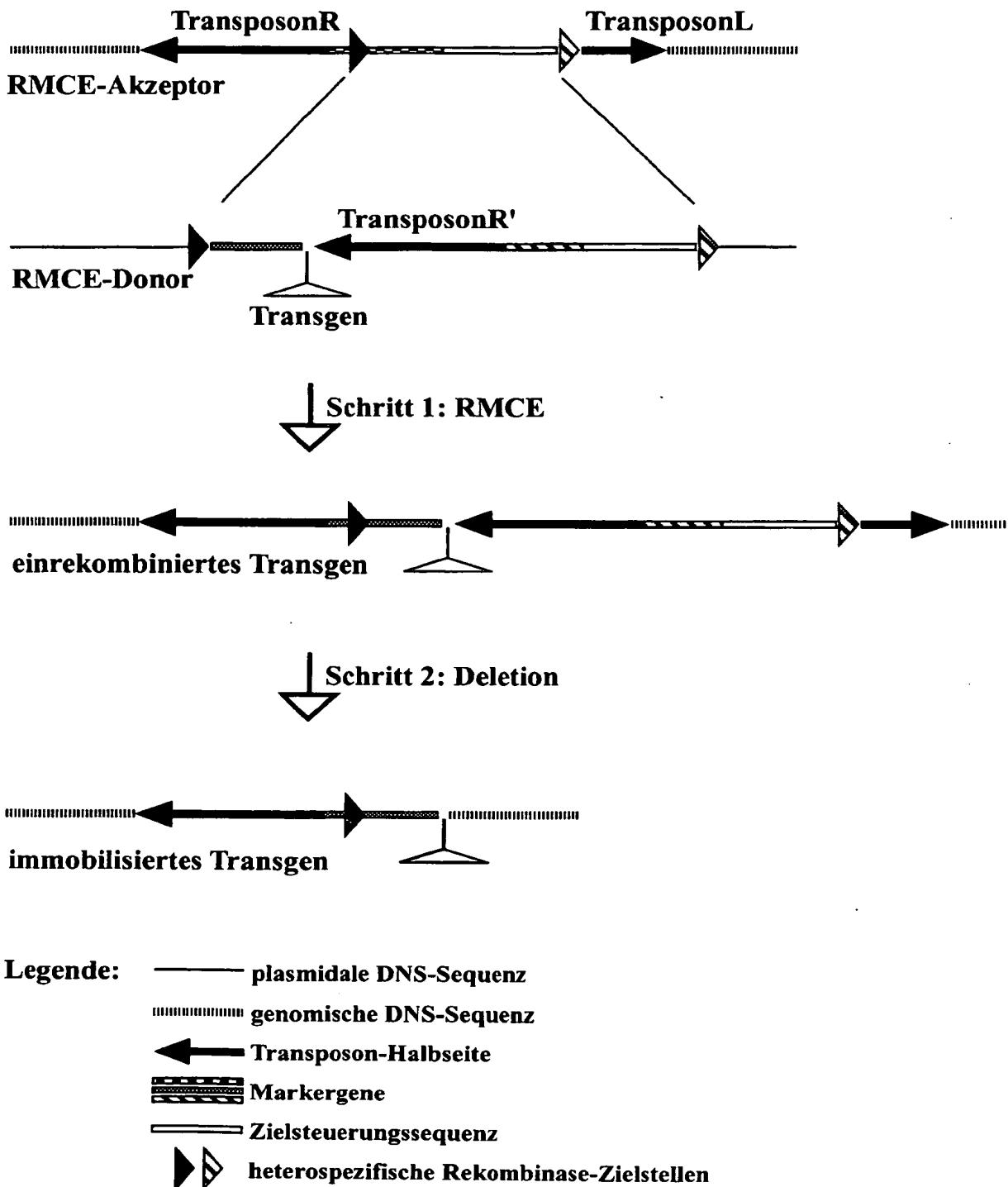


Abb. 2:

**RMCE mit anschließender Transposonexzision**



**Abb. 3:**

**Ausgestaltung des in Abb. 1 gezeigten Prinzips**

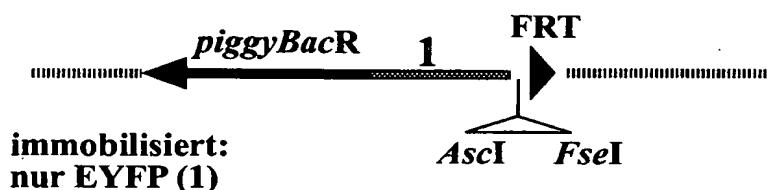
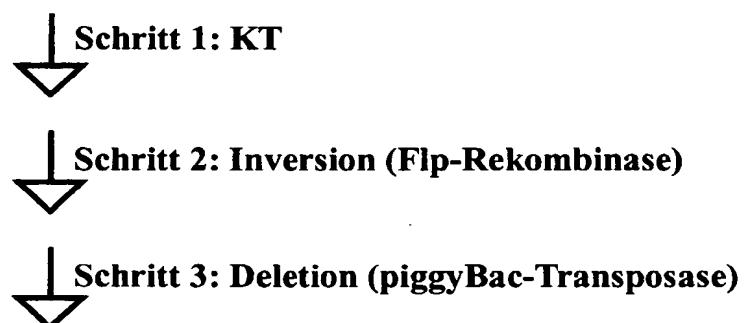
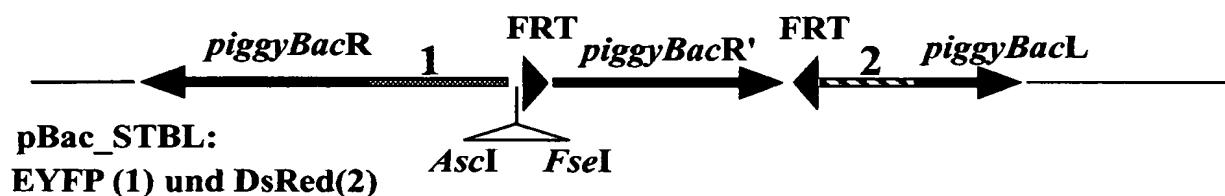


Abb. 4:

**Ausgestaltung des in Abb. 2 gezeigten Prinzips**

